

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in**  
**“Riproduzione, Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo”**  
**XVIII Ciclo**  
Coordinatore: prof. C. Pignata

**IMPIEGO DELL’LH NELL’INDUZIONE DELLA**  
**CRESCITA FOLLICOLARE MULTIPLA**

**Tutore**

**Ch.mo prof. Giuseppe De Placido**

**Candidato**

**Dr. Antonio Ranieri**

# INDICE

## Capitolo 1. Gonadotropine esogene nella stimolazione ovarica controllata

- Basi biologico-molecolari della follicologenesi Pag. 05
- Struttura e funzioni dell'LH Pag. 07
- L'induzione della crescita follicolare multipla Pag. 10

## Capitolo 2. Linee di Ricerca

- LH esogeno e resistenza ovarica alla monoterapia con rFSH in corso di  
ICFM Pag. 16  
Studio "*dose finding*"  
Studio di "efficacia"
- Polimorfismo dell'LH Pag. 18  
Ruolo della V $\beta$ LH

## Capitolo 3. Discussione dei dati sperimentali

- "Steady response" Pag. 20
- Polimorfismo dell'LH Pag. 26

## Capitolo 4. Conclusioni e nuove prospettive

- La farmacogenomica nella ICFM Pag. 32



**Lavori scientifici prodotti nel corso del Dottorato inerenti le linee di ricerca.**

**Allegato 1**

DE PLACIDO G, MOLLO A, ALVIGGI C, STRINA I, VARRICCHIO MT, RANIERI A, COLACURCI N, TOLINO A and WILDING M.

*Rescue of in vitro fertilisation cycles by human menopausal gonadotrophin in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterised by a poor initial response to recombinant follicle stimulating hormone.* Human Reproduction, 2001;16(9) pagg.1875-9.

**Allegato 2**

DE PLACIDO G, ALVIGGI C, MOLLO A, STRINA I, RANIERI A, ALVIGGI E, WILDING M, VARRICCHIO MT, BORRELLI AL, CONFORTI S.

*Effects of rLH supplementation during COH in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to rFSH after pituitary down-regulation.* Clinical Endocrinology, 2004;60:pagg.637-43.

**Allegato 3**

DE PLACIDO G, ALVIGGI C, PERINO A, STRINA I, RANIERI A, LISI F, FASOLINO A, DE PALO R, COLACURCI N, MOLLO A.

*Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (r-hFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to r-hFSH. A multicentre, prospective, randomised controlled trial.* Human Reproduction, 2005; 20(2): 390-6.

**Allegato 4**

ALVIGGI C, MOLLO A, CLARIZIA R, RANIERI A, DE PLACIDO G.

*Who needs LH in ovarian stimulation?* RBM Online. Volume 12, n.5 may 2006.

**Allegato 5**

ALVIGGI C, PETTERSON K, MOLLO A, CLARIZIA R, STRINA I, COPPOLA M, RANIERI A, DE PLACIDO G.

*Impaired multiple follicular development in carriers of Trp8Arg and Ile15Thr LH-beta variant undergoing controlled ovarian stimulation.* Abstract of the 21th Annual Meeting of the ESHRE, Copenhagen, 19-22 June 2005.

**Allegato 6**

RANIERI A, ALVIGGI C, MOLLO A, STRINA I, VARRICCHIO MT, AMATO V, CLARIZIA R, COPPOLA M, DE MARINO C, DE PLACIDO G.

*Frequenza della variante beta-LH Trp8 Arg e Ile15-Thr in pazienti normogonadotrope, normoovulatorie che presentano inadeguata risposta ovarica alla stimolazione ovarica controllata in corso di cicli ART. Atti LXXXI Congresso SIGO, Bologna 2005.*

**Allegato 7**

ALVIGGI C, CLARIZIA R, PETTERSON K, MOLLO A, STRINA I, RANIERI A, COPPOLA M, PIROZZI I, DE PLACIDO G.

*Association between different profiles of ovarian response to rFSH and a point mutation of native LH.* Abstract of the 22th Annual Meeting of the ESHRE, Prague, 19-22 June 2006.

## Cap. 1

### Gonadotropine esogene nella stimolazione ovarica controllata

#### **a. Basi biologico- molecolari della follicologenesi**

Le cellule gonadotrope costituiscono circa il 10% della popolazione cellulare dell'ipofisi anteriore e producono due gonadotropine, il *luteinising hormone* (LH) e il *follicle stimulating hormone* (FSH). Come il *thyroid stimulating hormone* (TSH) e la *human chorionic gonadotropin* (hCG), l'LH e l'FSH sono ormoni glicoproteici costituiti da due subunità:  $\alpha$  e  $\beta$ . La subunità  $\alpha$  è comune a tutti questi ormoni glicoproteici, mentre la specificità viene conferita dalle subunità  $\beta$ , codificate da geni diversi [Fig. 1]. La sintesi ed il rilascio delle gonadotropine sono fenomeni dinamicamente regolati. Questo è vero in particolare nella donna in cui i livelli rapidamente fluttuanti degli steroidi gonadici variano durante il ciclo mestruale. Il *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) ipotalamico, un peptide di 10 aminoacidi sintetizzato nella regione preottica, regola la sintesi e la secrezione di entrambe le gonadotropine. Il GnRH viene secreto con impulsi ogni 60-120 minuti e questi impulsi, a loro volta, determinano quelli di LH ed FSH. Il GnRH agisce tramite un recettore accoppiato alle proteine G per attivare la via della fosfolipasi C, della proteinchinasi C del calcio intracellulare. La modalità pulsatile della secrezione è fondamentale per l'azione del GnRH; essa infatti determina il *priming* delle cellule gonadotrope, mentre la produzione continua dell'ormone ne provoca la desensibilizzazione. Basandosi su questo fenomeno, gli analoghi del GnRH (GnRH-a) vengono utilizzati per sopprimere i livelli di gonadotropine nei bambini con pubertà precoce, negli uomini con carcinoma della prostata, nelle donne con endometriosi genitale ed extragenitale (stadi I-IV), nel trattamento della fibromiomatosi uterina e sono usati in alcuni protocolli per indurre l'ovulazione al fine di ridurre la produzione endogena di gonadotropine. Gli estrogeni agiscono a livello ipotalamico ed ipofisario per regolare la secrezione di gonadotropine. L'esposizione cronica agli estrogeni ha un effetto inibitorio sia sulla funzione ipotalamica che ipofisaria, mentre livelli crescenti di estrogeni, come si osserva nel picco pre-ovulatorio, esercitano un *feedback* positivo aumentando l'ampiezza e la frequenza di immissione in circolo delle gonadotropine. Il progesterone, al contrario, riduce la frequenza della pulsatilità ma esalta la risposta delle gonadotropine al GnRH. Nei maschi il *feedback* negativo esercitato dal testosterone si

esplica sia a livello ipotalamico che ipofisario ed in parte riflette la conversione periferica in estrogeni. Nonostante il GnRH sia il fattore principale che regola la secrezione di FSH ed LH, la sintesi di FSH è anche sotto il controllo dei peptici gonadici attivina ed inibina, che fanno parte della famiglia dei fattori di crescita trasformanti  $\beta$ . L'inibina inibisce selettivamente la secrezione di FSH, mentre l'attivina ne stimola la sintesi. Le gonadotropine interagiscono con i rispetti recettori accoppiati alle proteine G espressi sull'ovaio e sul testicolo, inducendo lo sviluppo e la maturazione delle cellule germinali, e la biosintesi degli ormoni sessuali. Nella donna, l'FSH regola lo sviluppo dei follicoli ovarici e stimola la produzione di estrogeni da parte dell'ovaio stesso. L'LH è, invece, responsabile del fenomeno dell'ovulazione e del mantenimento del corpo luteo. Nell'uomo, l'LH induce la sintesi e la secrezione di testosterone da parte delle cellule del *Leydig*, mentre l'FSH stimola lo sviluppo dei tubuli seminiferi e regola la spermatogenesi.

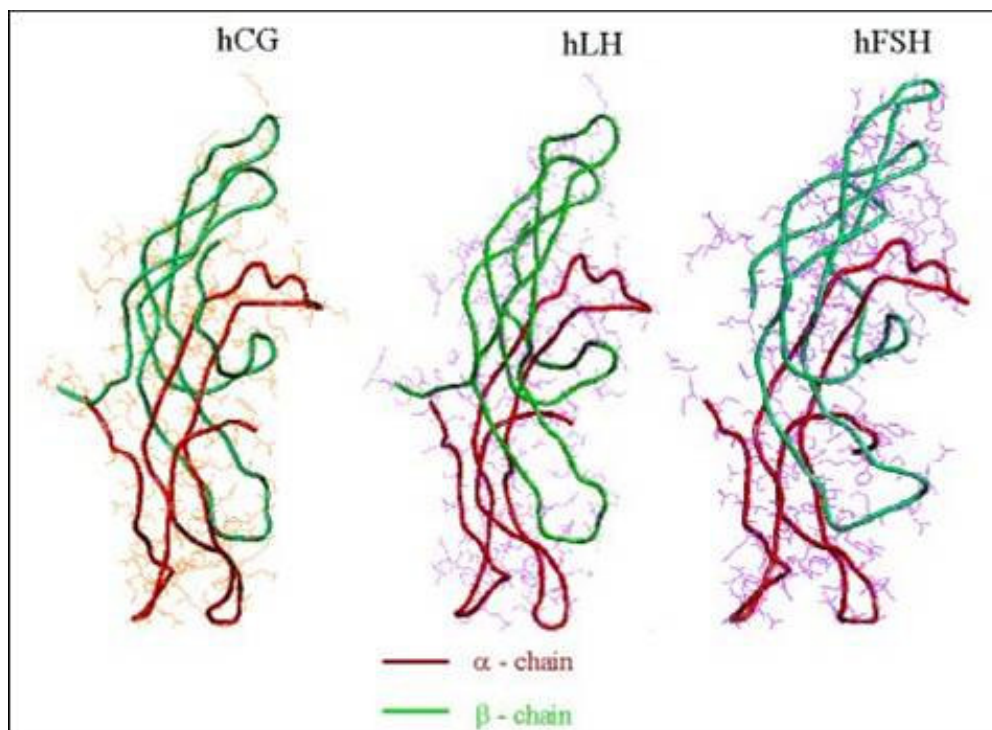


Fig. 1



## Cap. 1

### Gonadotropine esogene nella stimolazione ovarica controllata

#### **b. Struttura e funzioni dell'LH**

L' LH è una glicoproteina, la cui struttura è composta da un 20% di carboidrati, formata da due catene  $\alpha$  e  $\beta$  unite tra loro da un legame non covalente ad elevata affinità. Nonostante sia la subunità  $\beta$  la sola dotata di specificità d'azione, è necessaria la combinazione con la subunità  $\alpha$  perché l'azione si manifesti. Probabilmente esistono due ragioni di questo fenomeno: o la presenza della catena  $\alpha$  è indispensabile per il riconoscimento recettoriale o perché, solo dopo la combinazione con quest'ultima, la subunità  $\beta$  acquista la conformazione atta a riconoscere il recettore ed esplicare la propria funzione. Le tappe biosintetiche dell'LH sono analoghe a quelle comuni alla sintesi delle proteine. I geni che lo codificano sono organizzati secondo uno schema generale che prevede sequenze che compaiono negli RNA messaggeri maturi (esoni) e sequenze che vengono trascritte nei precursori degli mRNA e poi rimosse durante il processo di maturazione del trascritto primario (introni). La catena  $\alpha$ , comune all'FSH, al TSH e all'hCG, è codificata da un singolo gene di 4 esoni localizzato sul cromosoma 6q12; la catena  $\beta$  dell'LH e dell' hCG è posta sul cromosoma 19q13 è composta da un *cluster* di un gene per l'LH  $\beta$  e sei pseudogeni per l'hCG  $\beta$ . La differenza strutturale tra i due ormoni è la presenza, nella proteina di origine placentare, di una porzione C terminale aggiuntiva di 29 aminoacidi che contiene 4 siti addizionali di glicosilazione che conferisce all'hCG un'emivita nettamente più lunga rispetto all'LH. La biosintesi dell'LH è regolata a livello trascrizionale da vari ormoni o fattori di trascrizione, che agiscono mediante interazioni all'estremità 5' e 3' del gene bersaglio. Esistono infatti sequenze particolari, generalmente poste a monte del sito di inizio della trascrizione, a struttura palindromica, costituite cioè da 25-30 nucleotidi con elevato grado di omologia, che rispondono agli ormoni regolatori (HRE, *hormone response elements*) modificando la velocità del gene trascritto. A ciò segue la maturazione del trascritto primario grazie allo *splicing* intronico, che permette la congiunzione degli esoni. Variazioni di questo processo possono portare alla formazione di mRNA diversi con sintesi di peptidi differenti. Numerose sono le modificazioni post-traduzionali che avvengono nel reticolo endoplasmatico e nel complesso di Golgi, che portano alla formazione di strutture

proteiche che, solo dopo il loro assemblaggio, costituiscono la struttura definitiva. A livello golgiano viene portata a termine la glicosilazione dell'LH. La gonadotropina esplica la sua funzione ormonale legandosi ad un recettore sito sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio [Fig. 2]. Il recettore appartiene alla famiglia delle proteine G, costituite da sette domini transmembrana; il dominio extracellulare, di dimensione variabile, è la sede di legame dell'ormone. La regione transmembrana è costituita da domini idrofobici ad  $\alpha$  elica che attraversano il doppio strato lipidico cellulare. Questi domini sono in grado di formare una tasca idrofobica dove va a posizionarsi il ligando. Il legame dell'ormone porta a modificazioni conformazionali dei domini transmembranari a cui segue la cascata intracellulare della trasmissione del segnale; complessi proteici intracellulari svolgono questa funzione grazie al loro legame con le proteine G. Tali proteine, in grado di legare nucleotidi guanidici (GTP e GDP), sono complessi eterodimerici formati da tre subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . La prima subunità contiene il sito di legame per il nucleotide guanidico e idrolizza il GTP in GDP; le subunità  $\beta$  e  $\gamma$ , tra loro strettamente legate, modulano l'attività della subunità  $\alpha$  e interagiscono con le vie di trascrizione del segnale intracellulare. Il legame dell'ormone con il recettore consente il legame della subunità  $\alpha$  al GTP, che può così dissociarsi dal complesso  $\beta\gamma$  ed, attivandosi, media la trasduzione del segnale a livello intracellulare, interagendo con l'adenilato ciclasi che provoca un' aumentata concentrazione di cAMP. L' idrolisi del GTP in GDP inattiva la sequenza e rende il recettore di nuovo disponibile al legame recettoriale. Il ruolo dell'LH si esplica sulle cellule tecali per tutto il tempo della maturazione follicolare; il risultato di questa stimolazione è la produzione degli androgeni. Quando il follicolo ovarico ha raggiunto la completa maturazione, l'improvvisa elevazione preovulatoria dell'LH, dopo un periodo di stimolazione, provoca un effetto inibitorio sulla steroidogenesi che si manifesta allorché i livelli plasmatici non hanno ancora raggiunto i valori massimi e si traduce a livello follicolare in una brusca caduta preovulatoria della secrezione di estrogeni ed androgeni. L'azione dell'LH sulle cellule della granulosa si manifesta alla fine della fase follicolare, dopo la comparsa dei recettori specifici. L'LH provoca un arresto della proliferazione della granulosa, una diminuzione del numero dei recettori per l'FSH e l'inizio della secrezione intrafollicolare di progesterone cui segue l'inizio della luteinizzazione, anche se questa non può essere estremamente parziale prima dell'ovulazione per l'azione inibitoria di sostanze presenti nel liquido follicolare, in particolare l'estradiolo ( $E_2$ ) e l'inibitore proteico della luteinizzazione. Il picco preovulatorio dell'LH è essenziale per l'ovulazione, nonché per

la maturazione dell'ovocita con conseguente ripristino della divisione meiotica, arrestatasi durante la vita fetale. L'LH supporta, inoltre, la secrezione endocrina del corpo luteo, per la cui normale funzione è necessaria la costante presenza di questa gonadotropina. Infine, l'LH controlla l'attività del tessuto stromale ovarico la cui capacità steroidogenetica risulta notevolmente potenziata dalla presenza di tassi elevati di LH. L'azione combinata dell'FSH e dell'LH determina quindi la selezione dei follicoli che si svilupperanno e produrranno sufficienti quantità di  $E_2$  tali da provocare il picco di LH e, quindi, dell'evento ovulatorio.

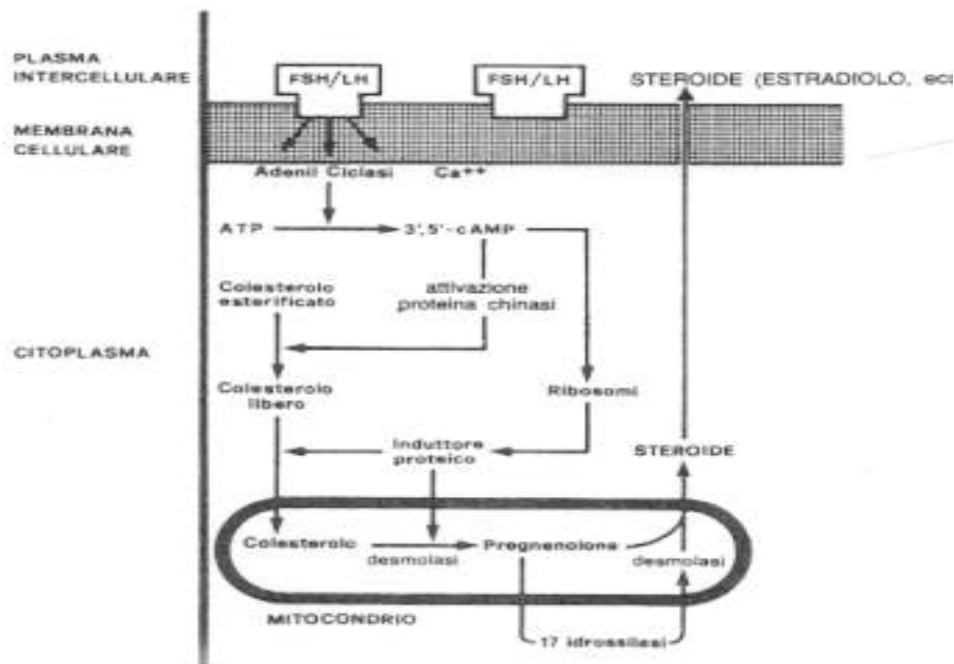


Fig. 2

## Cap 1

### Gonadotropine esogene nella stimolazione ovarica controllata

#### **c. L'induzione della crescita follicolare multipla**

L'impiego delle gonadotropine esogene nei protocolli di induzione della crescita follicolare multipla (ICFM) poggia le proprie radici nella cosiddetta “teoria delle due cellule” (Falk, 1987; Filicori, 1999; Lèvy et al., 2000). Secondo questa teoria, si possono distinguere a livello ovarico due compartimenti, la granulosa e la teca interna, targets rispettivamente dell'attività biologica dell'FSH e dell'LH. Il legame dell'FSH ai propri recettori, rappresentati particolarmente dalle cellule della granulosa durante la fase follicolare del ciclo, produce tre effetti fondamentali: la proliferazione cellulare, l'induzione dell'aromatasi, enzima responsabile della conversione del substrato androgenico in  $E_2$  ed, infine, l'induzione dell'espressione dei recettori per l'LH. Si realizza, quindi, una sorta di *priming* sul compartimento della granulosa che, nel corso della fase follicolare medio-avanzata, risulterà adeguatamente recettivo all'azione diretta dell'LH.

Quest'ultimo estrinseca, nel corso di tutta la fase follicolare, la propria attività biologica sulle cellule dello stroma e della teca interna, inducendo la biosintesi degli androgeni (in prevalenza  $\Delta 4$ -Androstenedione e Testosterone) a partire dal colesterolo circolante. Questi, diffondendosi nel compartimento delle cellule della granulosa, vengono convertiti in  $E_2$  dall'aromatasi. La produzione di estrogeni ovarici rappresenta, quindi, il risultato dell'azione sinergica di FSH ed LH nei due compartimenti follicolari: teca e granulosa (Ericson, 1995) [Fig. 3].

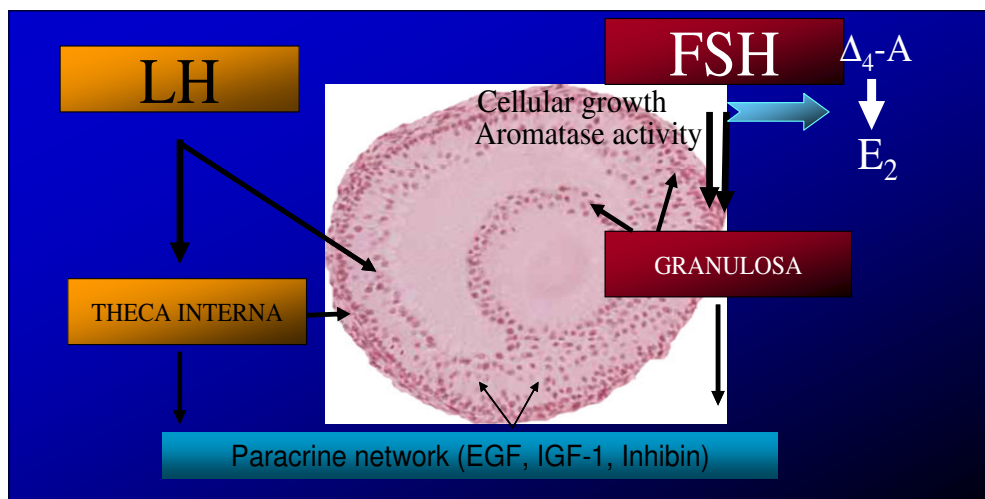


Fig. 3

Nella fase follicolare avanzata, l'azione dell'LH si verifica in particolare nel compartimento della granulosa con l'attivazione dei meccanismi che conducono allo scoppio del follicolo e, quindi, all'evento ovulatorio (Schoot et al., 1992). Tuttavia è plausibile che, da un certo momento della crescita follicolare, l'LH possa, da solo, sostenere l'intero processo e sia anzi fondamentale per la selezione del follicolo dominante. Sulla base di tale teoria, la somministrazione contemporanea di FSH ed LH, ormoni peraltro presenti in quantità sovrapponibili nei preparati estrattivi a base di *human menopausal gonadotropin* (hMG), contrassegnati da un rapporto FSH/LH di 1:1, sembrava inizialmente indispensabile nei procedimenti di induzione alla superovulazione ai fini del reclutamento e del mantenimento della crescita follicolare multipla fino alle fasi pre-ovulatorie. Nel tempo si è osservato, invece, come la presenza di livelli di LH sovrafisiologici (di origine endogena e/o conseguenziale alla somministrazione esogena dell'ormone) durante la fase proliferativa precoce-intermedia comportasse una serie di effetti deleteri sulla maturazione follicolare (concetto dell' *LH ceiling*), tali da riflettersi in un decremento significativo della qualità ovocitaria (Polan, 1986). Verosimilmente, il riscontro di tali dati si poneva in relazione ad alterazioni della quantità e dei rapporti esistenti tra i differenti androgeni intra-follicolari. Si tratta di un fenomeno analogo a quello che si verifica nel corso di cicli spontanei in alcune condizioni patologiche come la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS): l'aumento degli androgeni nel micro-ambiente follicolare tipici della PCOS, indotti dalle concentrazioni elevate di LH circolante, si

riflette in una riduzione dell'attività dell'aromatasi, con un aumento di androgeni non più convertiti nei rispettivi ormoni femminili. Ne deriverebbe, quindi, una errata modulazione della biosintesi estrogenica, con livelli sierici di  $E_2$  che tenderanno a mantenersi medio-bassi, nonché un arresto della maturazione follicolare ed un'alterazione dei meccanismi di selezione del follicolo dominante. In caso, quindi, di somministrazioni di dosi esogene di LH eccessive durante i cicli di induzione della crescita follicolare multipla (ICFM), si osserva la tendenza ad una maturazione ovocitaria accelerata con il conseguenziale riscontro, al momento della esecuzione della tecnica di procreazione medicalmente assistita (PMA), di ovociti post-maturi. Queste evidenze hanno spinto verso l'impiego di FSH estrattivo contrassegnato da un grado sempre più elevato di purificazione e quindi di una quota di LH sempre più esigua; l'impiego nella pratica clinica di FSH purificato si è rilevato in grado di garantire un'adeguata maturazione follicolare multipla con l'ottenimento di un soddisfacente numero di ovociti di buona qualità. L'apice di tale evoluzione farmacologia è rappresentato dai preparati ottenuti grazie all'ingegneria genetica a base di FSH ricombinante (rFSH) totalmente privi di attività LH. La recente disponibilità di preparati a base di LH ricombinante (rLH) ha inoltre reso possibile una più precisa valutazione degli effetti derivanti dalla somministrazione di questo ormone in caso di stimolazione ovarica controllata, in donne normogonadotrope sottoposte a cicli *long protocol* con soppressione con agonisti del GnRH. Molte evidenze accumulate nel corso degli anni hanno spinto i ricercatori a ritenere la somministrazione di LH esogeno in corso di ICMF non necessaria, se non addirittura dannosa.

L'apparente discrepanza tra i presupposti fisiologici ("teoria delle due cellule") e la pratica clinica (ICFM ottimale con il solo impiego di rFSH) è spiegabile sulla base di alcune importanti acquisizioni. In primo luogo, è stato dimostrato che l'LH endogeno è in grado, in presenza di FSH, di elicitare una biosintesi androgenica massimale, anche se legato soltanto ad una quantità inferiore all'1% dei propri recettori espressi dalle cellule della teca (*spare receptor hypothesis*) (Chappel e Howles, 1991); le concentrazioni endogene di LH in corso di ciclo spontaneo e finanche i livelli circolanti di ormoni residui alla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio con analoghi del GnRH sembrerebbero essere sufficienti, nella maggior parte dei casi, ad occupare tale quota recettoriale e, quindi, a sostenere l'attività dell'FSH esogeno. Ciononostante, in una quota di pazienti oscillanti tra il 10 e il 30%, la ICMF non esita in una risposta ovarica soddisfacente. Tale fenomeno, definito *poor response*, riconosce verosimilmente fattori etio-patogenetici multipli e, nella maggior parte dei casi, non definiti. È possibile

ipotizzare che un sottogruppo di pazienti poor responders presenti una risposta inadeguata alla combinazione di GnRH-a in regime di long protocol e rFSH, in relazione ad un grado eccessivo di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario e, quindi, ad una insufficiente attività LH residua (Levy et al., 2000). Tali pazienti, a differenza di quanto osservato nelle popolazioni normoresponsive, potrebbero beneficiare dell'uso di preparazioni contenenti LH (Lèvy et al., 2000; Westergaard et al., 2000; De Placido et al., 2001), la cui somministrazione dovrebbe essere calibrata al fine di non produrre concentrazioni circolanti eccessivamente alte e potenzialmente dannose (Chappel e Howles, 1991). E' stato recentemente suggerito che la necessità di somministrare LH esogeno coincida con il riscontro di concentrazioni sieriche circolanti dell'ormone inferiori a 1.2 UI/l. In realtà i livelli plasmatici di LH (immunoreattivo) dosati sia nel corso di cicli spontanei, sia dopo soppressione con GnRH-a nelle differenti fasi di somministrazione di gonadotropine esogene, non si sono rivelate, in alcuno studio clinico controllato, predittivi rispetto al potenziale di risposta ovarica delle pazienti sopresse con GnRH-a e sottoposte ad una monoterapia con rFSH (De Placido et al., 2001; Werlin et al., 2001).

Sulla base dei dati riportati è quindi possibile concludere che non sono attualmente disponibili *tests* biochimici in grado di identificare "a priori" le pazienti che potrebbero trarre beneficio da una somministrazione di LH esogeno in corso di ICFM.

Il successo, quindi, delle metodiche di PMA si basa su un attenta scelta del protocollo di ICFM, su un accurato monitoraggio ecografico ed endocrino della paziente. Il *pregnancy rate* (o tasso di gravidanza), infatti, è direttamente proporzionale alla maturazione dei follicoli durante la stimolazione ovarica che si accompagna ad un numero adeguato di ovociti di buona qualità, dotati, cioè, di una maturazione soddisfacente. Attualmente, le procedure di PMA, con fecondazione extra-corporea degli ovociti prevedono, nella maggior parte dei casi, una fase di trattamento con analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH-a), una fase di ICFM vera e propria, realizzata con la somministrazione di gonadotropine esogene ed, infine, una procedura di fecondazione in vitro. Per ottimizzare i cicli di fecondazione assistita, le pazienti vengono classificate in relazione al potenziale di risposta ovarica. La precisa definizione di questi gruppi di pazienti è essenziale per il management della tecnica di fecondazione assistita, al fine di personalizzare il trattamento ed aumentare quindi le possibilità di successo. Diversi fattori fisiologici e patologici possono condizionare la risposta ovarica ai vari protocolli di induzione (età, insufficienza ovarica, PCOS, endometriosi, obesità). Tali

fattori devono essere presi in considerazione nella valutazione clinica, avvalendosi anche di tests di screening della riserva ovarica (FSH basale, E<sub>2</sub> basale, test al clomifene, test al GnRH, EFORT test, flussimetria ovarica, valutazione ecografia del volume ovarico e del numero di follicoli antrali). I parametri dotati di buona predittività per una adeguata risposta ovarica alla ICFM e di facile impiego pratico sono i seguenti:

- valori sierici basali di FSH;
- età;
- BMI ( body mass index) (kg/m<sup>2</sup>);
- quadro ecografico delle ovaie (volume e numero di follicoli antrali);
- risposta ovarica ad eventuali precedenti cicli di riproduzione assistita.

Sulla base di questi parametri, vengono considerate come pazienti a rischio di scarsa risposta ovarica (*poor responders*), le pazienti con età superiore ai 37 anni, valori di FSH basali >9 mUI/ml, BMI elevato (>28 kg/m<sup>2</sup>), e/o con inadeguata risposta ovarica ad un precedente ciclo di riproduzione assistita. Al contrario, vengono considerate a rischio di eccessiva risposta ovarica (*high responders*) le pazienti con valori di FSH basali <9 mUI/ml, età <37 anni, affette da policistosi ovarica, e/o che hanno avuto in precedenti stimolazioni una eccessiva risposta ovarica, con conseguente cancellazione del ciclo. Un altro fattore prognostico importante è considerato un BMI basso (<22 kg/m<sup>2</sup>). Infine le pazienti considerate *normal responders* sono donne di età <37 anni, un valore di FSH basale <9mUI/ml e un BMI nella norma. Nelle *normal* e *high responders* il protocollo cardine è il cosiddetto *long protocol*, che prevede una fase iniziale di trattamento con GnRH-a, con successiva soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico (*down regulation*) e una fase di ICFM con la somministrazione di gonadotropine. La desensibilizzazione può essere mantenuta per molti giorni, permettendo quindi una gestione razionale della stimolazione farmacologica. La soppressione del picco dell'LH è più efficace, anche se ciò comporta un numero di fiale maggiore. Con tale protocollo vengono eliminate tutte le interferenze della quota endogena di FSH ed LH; permette, inoltre, una sincronizzazione dei cicli di ICFM di diverse pazienti, potendo somministrare le gonadotropine in qualsiasi momento. Per le pazienti a rischio di inadeguata risposta ovarica, si procede con protocolli *short* e *ultrashort*, che prevedono la somministrazione concomitante di GnRH-a e gonadotropine al fine di potenziare la fase iniziale di stimolazione attraverso la dismissione massiva della quota endogena di FSH ed LH (*flare up protocol*). L'incremento dei livelli circolanti di LH nelle fasi precoci della



stimolazione, dovuto a minore soppressione pituitaria, aumenta il rischio di compromissione della qualità ovocitaria nelle pazienti sottoposte a tale trattamento. In coloro, invece, che hanno dimostrato una eccessiva risposta ovarica a precedenti cicli di ICFM e nelle donne affette da ovaio policistico, è preferibile l'utilizzo di *long protocol*, con dosi crescenti di gonadotropine a partire da dosi giornaliere di 50-75 UI (*step up protocol*). L'impiego degli antagonisti del GnRH (GnRH-ant), invece, consente di attuare un protocollo di stimolazione ovarica semplice e di breve durata con le sole gonadotropine, limitando la somministrazione degli antagonisti ai soli giorni prossimi al picco precoce di LH. A differenza degli agonisti, questi ultimi agiscono con effetto immediato (entro poche ore) mediante un legame competitivo con i recettori del GnRH senza indurre alcuna attivazione di tali recettori e senza alcuna stimolazione iniziale. La somministrazione dei GnRH-ant viene riservata, di solito, alle pazienti con scarsa risposta ovarica con l'impiego dei GnRH-a, anche in protocolli *short* e *ultrashort*.

Cap. 2

Linee di ricerca

**LH esogeno e resistenza ovarica alla  
monoterapia con rFSH in corso di ICFM**

Sulla base delle evidenze esposte nel precedente capitolo, allo scopo di caratterizzare il *subset* di pazienti che necessita di una supplementazione di LH per raggiungere una ICFM adeguata, si è cercato di sviluppare strategie di trattamento di agevole applicazione nella pratica clinica.

In tale ottica presso il Dipartimento di Emergenze Ostetriche e Ginecologiche e Medicina della Riproduzione dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" avevamo già realizzato nel 2001 uno studio prospettico randomizzato finalizzato a valutare l'efficacia di una supplementazione con LH esogeno, in corso di stimolazione, nelle pazienti con iniziale risposta inadeguata all'ICFM con GnRH-a *long protocol* + rFSH il cui testo è riportato in **allegato 1** [DE PLACIDO G, MOLLO A, ALVIGGI C, STRINA I, VARRICCHIO MT, RANIERI A, COLACURCI N, TOLINO A and WILDING M. *Rescue of in vitro fertilisation cycles by human menopausal gonadotrophin in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterised by a poor initial response to recombinant follicle stimulating hormone*. Human Reproduction, 2001;16(9) pagg.1875-9].

Nella maggior parte delle pazienti si è evidenziato un recupero del ciclo di ICFM, con un *outcome* ovarico significativamente superiore rispetto a quello osservato in soggetti trattati con un incremento (*step up*) delle dosi di rFSH e, comunque, sovrapponibile a quanto riportato in una popolazione di controllo rappresentata da *normal responders*. Tale studio è stato realizzato con preparati di estrazione (hMG) contrassegnati da un rapporto 1:1 di LH ed FSH; pertanto, la somministrazione di LH è stata vincolata, al fine di mantenere invariata la dose totale di FSH, all'introduzione di una quota di FSH di estrazione e ad una parallela riduzione del dosaggio della molecola ricombinante. La possibilità di impiego indipendente delle due gonadotropine ricombinanti, oltre a garantire un maggiore controllo delle quantità di farmaco realmente somministrate (omogeneità dei lotti), potrebbe consentire la messa a punto di dosaggi

“personalizzati” in grado di ottimizzare la risposta ovarica e le probabilità di successo in ciascuna paziente, evitando, al tempo stesso il rischio di esposizione a quote di LH troppo elevate e potenzialmente deleterie.

Partendo da tali premesse, abbiamo disegnato altri due studi clinici volti ad individuare la necessità e le modalità della supplementazione di LH in corso di ICFM.

In un primo studio di *dose-finding* abbiamo valutato, in pazienti con risposta inadeguata alla monoterapia con rFSH, l'efficacia della supplementazione di rLH in due differenti dosaggi (75 UI e 150 UI) [**allegato 2**: DE PLACIDO G, ALVIGGI C, MOLLO A, STRINA I, RANIERI A, ALVIGGI E, WILDING M, VARRICCHIO MT, BORRELLI AL, CONFORTI S. *Effects of rLH supplementation during COH in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to rFSH after pituitary down-regulation*. Clinical Endocrinology, 2004;60:pagg.637-43]. In tale studio abbiamo dimostrato che, in termini clinici, la supplementazione di 150 UI di rLH nei pazienti in oggetto risulta essere più vantaggiosa rispetto alla supplementazione di sole 75 UI.

Nel secondo studio abbiamo disegnato uno studio multicentrico prospettico randomizzato finalizzato a valutare in pazienti con risposta inadeguata alla monoterapia con rFSH, l'efficacia della somministrazione di una quota esogena di 150 UI di rLH rispetto all'incremento della dose (*step up*) di rFSH [**allegato 3**: DE PLACIDO G, ALVIGGI C, PERINO A, STRINA I, RANIERI A, LISI F, FASOLINO A, DE PALO R, COLACURCI N, MOLLO A. *Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (r-hFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to r-hFSH. A multicentre, prospective, randomised controlled trial*. Human Reproduction, 2005; 20(2): 390-6].

L'interesse della comunità scientifica internazionale nei confronti di questo filone di ricerca è stato tale che siamo stati invitati dalla rivista Reproductive Biology On Line a redigere una *review* sull'argomento. [**allegato 4**: ALVIGGI C, MOLLO A, CLARIZIA R, RANIERI A, DE PLACIDO G. *Who needs LH in ovarian stimulation?* RBM Online. Volume 12, n.5 may 2006.

Cap. 2  
Linee di ricerca  
**Ruolo del polimorfismo LH**

I risultati dei lavori sopra riportati hanno quindi evidenziato il dato clinico che esiste un *subset* di donne eumenorroiche e normogonadotrope che necessita della supplementazione di LH per ottenere una risposta adeguata alla ICFM in corso stimolazione con solo FSH esogeno.

Linea di ricerca di questo lavoro è, inoltre, lo studio dei possibili meccanismi etiopatogenetici alla base di questa peculiare risposta clinica che abbiamo definito *steady response*.

Abbiamo ipotizzato che tali pazienti possano presentare un LH endogeno contrassegnato da una ridotta “attività biologica”: l’ormone sarebbe in grado di sostenere la crescita follicolare spontanea, laddove, in condizioni di stimolo sovralfisiologico (ICFM), risulterebbe inadeguato, nonostante la presenza di concentrazioni circolanti apparentemente normali.

La nostra attenzione si è focalizzata sul possibile ruolo di isoforme della subunità  $\beta$  dell’LH ( $V\beta$ -LH) che sembrano essere particolarmente rappresentate in alcune popolazioni. Tale polimorfismo scoperto dal gruppo finlandese di Petterson, sembra avere nella popolazione italiana un’incidenza del 13%, percentuale sovrapponibile a quella delle *steady responders*. Tuttavia, non esistono in letteratura evidenze relative all’impatto che tali polimorfismi hanno sull’attività biologica della molecola, soprattutto in condizioni di stimolazione ovarica controllata. A questo scopo, abbiamo disegnato uno studio, proprio in collaborazione con Petterson, al quale abbiamo inviato i sieri per la ricerca della  $V\beta$ -LH, volto a valutare la frequenza del polimorfismo tra le pazienti in oggetto e tra le normali risponditrici.

I dati sperimentali preliminari sembrano indicare una frequenza maggiore di donne portatrici dell’isoforma  $V\beta$ -LH tra quelle che hanno presentato una *steady response*.  
[allegato 5: ALVIGGI C, PETTERSON K, MOLLO A, CLARIZIA R, STRINA I,

COPPOLA M, RANIERI A, DE PLACIDO G. *Impaired multiple follicular development in carriers of Trp8Arg and Ile15Thr LH-beta variant undergoing controlled ovarian stimulation*. Abstract of the 21th Annual Meeting of the ESHRE, Copenhagen, 19-22 June 2005.] [**allegato 6**: RANIERI A, ALVIGGI C, MOLLO A, STRINA I, VARRICCHIO MT, AMATO V, CLARIZIA R, COPPOLA M, DE MARINO C, DE PLACIDO G. *Frequenza della variante beta-LH Trp8 Arg e Ile15-Thr in pazienti normogonadotrope, normoovulatorie che presentano inadeguata risposta ovarica alla stimolazione ovarica controllata in corso di cicli ART*. Atti LXXXI Congresso SIGO, Bologna 20-24 settembre 2005.] [**allegato 7**: ALVIGGI C, CLARIZIA R, PETTERSON K, MOLLO A, STRINA I, RANIERI A, COPPOLA M, PIROZZI I, DE PLACIDO G. *Association between different profiles of ovarian response to rFSH and a point mutation of native LH*. Abstract of the 22th Annual Meeting of the ESHRE, Prague, 19-22 June 2006.]

### Cap 3

#### Discussione dei dati sperimentali

##### a. “Steady response”

In circa il 10-15% delle giovani donne normogonadotrope, la risposta ovarica all'associazione di GnRH-a *long protocol* e rFSH risulta subottimale, nonostante l'assenza di variabili prognostiche avverse (De Placido *et al.*, 2004; Ferraretti *et al.*, 2004). E' stato ipotizzato che, in questi casi, siano coinvolti meccanismi LH dipendenti: a causa di un grado eccessivo di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario, l'attività della gonadotropina endogena potrebbe, infatti, cadere al di sotto di un ipotetica soglia di risposta follicolare. Sfortunatamente, i *trials* clinici non sono riusciti ad identificare valori sierici di riferimento, capaci di indicare in maniera inequivocabile la necessità di una supplementazione di LH durante l'ICFM, suggerendo che i livelli circolanti della gonadotropina possano non essere rappresentativi del bisogno ormonale follicolare. Su questa base, vari autori hanno testato l'efficacia della supplementazione di LH in donne selezionate in base a specifici profili di risposta ovarica a dosi standard di rFSH. Nel 2001, Lisi *et al.* ha riportato un *self-control study* mirato a valutare gli effetti dell'aggiunta di rLH in pazienti che, nel corso di una precedente stimolazione con rFSH, avevano richiesto una dose cumulativa di farmaco >3000 UI per raggiungere la maturità follicolare. Le donne avevano un FSH basale medio di 12.2 UI/l ed una età media di 36.1 anni. Il protocollo di ristimolazione prevedeva l'aggiunta di una dose giornaliera di rLH di 75 UI dal 7° giorno di somministrazione a regime standard con rFSH. In entrambi i cicli, tutte le pazienti sono state sottoposte a GnRH-a *long protocol*: una dose giornaliera di triptorelina di mg 0.1 è stata somministrata dalla fase medio luteale. Comparando l'*outcome* dei due cicli consecutivi non sono emerse differenze significative nel consumo totale di rFSH, nel numero di giorni di stimolazione e nel numero di ovociti maturi. Al contrario, l'incidenza di fertilizzazione (86.0 versus 60.9%) e gravidanza (50.0 versus 5.9%) è apparsa significativamente più elevata ( $P < 0.05$ ) nelle pazienti trattate con rLH. Nonostante il numero non elevato di pazienti coinvolte e i limiti metodologici di *trials* non randomizzati, questo studio ha fornito la prima evidenza clinica a favore dell'ipotesi che una risposta subottimale al rFSH possa essere migliorata da un'attività LH esogena.

In un nostro precedente studio prospettico randomizzato (De Placido *et al.*, 2001) abbiamo ipotizzato che, a seguito di una desensibilizzazione con GnRH-a, le donne iporesponsive all'rFSH possono essere identificate già durante le fasi iniziali di stimolazione. Più specificamente, in circa il 10-12% di pazienti normogonadotrope si osserva un caratteristico profilo di risposta, contrassegnato da precoce arresto della crescita follicolare multipla. In genere, queste pazienti presentano almeno 5 follicoli (2-9 mm) in ciascun ovaio durante il 5° giorno di stimolazione. L'iniziale crescita di tali follicoli è, tuttavia, seguita da una fase di *plateau*: nei successivi 3-4 giorni di stimolazione non si osserva alcun incremento significativo in termini di grandezza follicolare e di E2, nonostante l'uso di un dosaggio di rFSH adeguato per l'età e per il BMI. Questa situazione porta, nella maggior parte dei casi, ad incrementare la dose giornaliera di rFSH (*step up protocol*). L'ipotesi, scaturita da tali osservazioni, è che le sopradescritte anomalie di risposta possano essere legate ad un deficit di attività LH; di riflesso, una supplementazione di LH esogeno potrebbe condurre ad un miglioramento della *performance* ovarica. In tale studio sono state reclutate soltanto donne di età <37 anni e bFSH <10UI/l, sottoposte a GnRH-a *long protocol* che, all'8° giorno di stimolazione con rFSH presentavano livelli sierici di E2<180 pg/ml associati alla assenza di follicoli ovarici di diametro superiore a 10 mm. Nel gruppo di studio (n = 20), è stata praticata un'aggiunta di LH, in forma di hMG (150 UI al giorno); la popolazione di controllo (n = 23) è stata sottoposta ad un incremento della dose giornaliera di rFSH (dose massima 375 UI). Nelle pazienti trattate con hMG si è evidenziato un incremento statisticamente significativo (P <0.05) del numero medio di ovociti recuperati rispetto a quelle sottoposte a protocollo rFSH *step-up*. In aggiunta, la risposta ovarica del gruppo hMG si è rivelata del tutto sovrapponibile a quella osservata in una popolazione di *normal responders* al rFSH, contrassegnata da caratteristiche antropometriche ed ormonali equiparabili, trattata presso lo stesso centro nell'ambito dello stesso arco temporale. I risultati osservati nel corso della sperimentazione sembrano confermare l'ipotesi che l'aggiunta di LH in donne con iniziale risposta inadeguata al rFSH fosse in grado di ripristinare un profilo di "normalità" e, quindi, di recuperare il ciclo di stimolazione in corso. Un aspetto da non trascurare è quello relativo alla misurazione dei livelli circolanti di LH delle pazienti all'8° giorno di stimolazione, prima dell'assegnazione ai due gruppi di studio. Nonostante una percentuale elevata di donne avesse tratto chiaro vantaggio dalla somministrazione di LH esogeno, non si erano evidenziate differenze significative nelle concentrazioni di ormone endogeno, tra quelle

in cui era stata praticata tale supplementazione e le *normal responders* all'rFSH ( $0.27 \pm 0.06$  versus  $0.39 \pm 0.35$ , rispettivamente). Queste evidenze suggeriscono l'esistenza di un sottogruppo di *poor responders* che può beneficiare di un trattamento esogeno di LH anziché di un incremento della dose giornaliera di rFSH, sebbene non ci sia un parametro di riferimento da utilizzare ai fini di una loro identificazione *a priori*.

Il passo successivo è stato standardizzare la somministrazione eterogenea di LH in questo gruppo selezionato di donne. Infatti le preparazioni a base di hMG sono caratterizzate da un contenuto eterogeneo di ormoni con differenti attività "LH-simili" (Filicori et al., 2003). In ogni caso, queste preparazioni sono contrassegnate dalla presenza di un rapporto costante tra FSH ed LH pari a 1:1; pertanto, la somministrazione di "attività LH" resta subordinata alla necessità di ridurre la dose giornaliera rFSH, al fine di non determinare cambiamenti significativi della dose cumulativa di FSH. Al contrario, il rLH offre l'opportunità di una somministrazione indipendente, calibrata e personalizzata di LH. Su tale base, l'efficacia della supplementazione di rLH in donne che mostrano una iniziale inadeguata all'rFSH abbiamo testato lo stesso sottogruppo di *poor responders* in uno studio prospettico randomizzato del tipo "*dose finding*" (De Placido et al.; 2004). Le modalità di somministrazione di GnRH-a e i criteri per la supplementazione di LH sono stati sovrapponibili a quelli adottati nello studio precedente (De Placido et al.; 2001). Pazienti con età <37 anni e bFSH < 10 UI/l hanno ricevuto una dose iniziale di rFSH compresa tra 150 e 300 UI al giorno. All'8° giorno di stimolazione, le donne con profilo ovarico e ormonale compatibile con una risposta inadeguata sono state randomizzate per ricevere una supplementazione con rLH alla dose giornaliera di 75 UI (n = 23) o 150 UI (n = 23). I risultati sono stati confrontati con quelli osservati in una popolazione di controllo di *normal responders* all'rFSH (n = 46). Nel gruppo trattato con 150 UI di rLH si è osservato un numero significativamente ( $P < 0.001$ ) più elevato di ovociti recuperati ed una percentuale significativamente maggiore di ovociti maturi ( $P < 0.05$ ), rispetto alle pazienti che avevano ricevuto la dose di 75 UI ( $9.65 \pm 2.16$  versus  $6.39 \pm 1.53$ , e 79% versus 65.7%, rispettivamente). I dati rilevati nel gruppo sottoposto a supplementazione con 150 UI di farmaco sono risultati del tutto equiparabili a quelli registrati nelle *normal responders* al rFSH (numero medio di ovociti:  $10.65 \pm 2.8$ ; ovociti maturi: 82.5%).

Sulla base di questi risultati preliminari, abbiamo valutato l'efficacia dell'rLH alla dose di 150 UI nella stessa tipologia di pazienti in un ulteriore studio prospettico randomizzato, a carattere multicentrico (De Placido et al., 2005) avente come standard di



riferimento l'rFSH *step up protocol*. Un totale di 229 cicli di IVF/ICSI compiuti in sette centri italiani è stato analizzato. In tutte le pazienti (età <37 anni, bFSH <10 UI/l), è stata somministrata triptorelina da 3.75 mg al giorno 1 di un ciclo spontaneo (GnRH-a *long protocol*). Una volta verificato lo stato di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario, è stata intrapresa la stimolazione con una dose iniziale di rFSH pari a 225 UI. All'8° giorno di stimolazione le risposte inadeguate sono state identificate sulla base dei seguenti criteri: livelli sierici di  $E_2$  <180 pg/ml e al massimo 6 follicoli di diametro compreso tra 6 e 10 mm, ma non follicoli >10mm. Attraverso una procedura di randomizzazione centralizzata, le pazienti sono state allocate in uno dei due gruppi di studio: quelle assegnate al gruppo rLH (n = 59) sono state sottoposte ad una supplementazione con dose giornaliera di farmaco pari a 150 UI a partire dallo stesso giorno. Le donne del gruppo rFSH (n = 58) sono state sottoposte ad un classico *step up protocol*: la dose giornaliera di rFSH è incrementata di 150 UI. Anche in questo caso, una popolazione di *normal responders* (livelli sierici di  $E_2$  triplicati tra il 5° e l'8° giorno, evidenza di un numero di follicoli >10 mm maggiore di 4a in 8a giornata) è stata selezionata come ulteriore gruppo controllo, non-randomizzato (n = 112). I risultati hanno evidenziato un *outcome* ovarico migliore nelle donne trattate con rLH rispetto a quelle sottoposte a rFSH *step up protocol*; in particolare, si è osservato un incremento statisticamente significativo ( $P < 0.01$ ) del numero ovociti recuperati e del numero di ovociti maturi ( $9.0 \pm 4.3$  versus  $6.1 \pm 2.6$ , e  $7.8 \pm 4.3$  versus  $4.7 \pm 1.6$ , rispettivamente). È importante evidenziare come il numero di ovociti maturi ed il tasso di gravidanza nel gruppo sottoposto a supplementazione con 150 UI di rLH siano risultati del tutto equiparabili a quelli registrati nelle *normal responders* (numero di ovociti maturi:  $7.8 \pm 4.3$  versus  $9.0 \pm 3.1$ ; tasso di gravidanza: 37.2 versus 47.3%, nei due gruppi, rispettivamente). Al contrario, entrambi i parametri (pari a  $4.7 \pm 1.6$  ed al 29.3%) sono risultati significativamente più bassi ( $P < 0.05$ ) nel gruppo trattato con rFSH *step up* rispetto alle *normal responders*. I livelli sierici di LH, misurati prima della randomizzazione, sono risultati sovrapponibili nei gruppi di studio e di controllo (mediana 0.7, range 0.1-3.6 UI/l versus mediana 0.7, range 0.1-4.0 UI/l).

Altri studi hanno valutato gli effetti della supplementazione di rLH in donne con iporesponsività iniziale all'rFSH. In particolare, Ferraretti *et al.* (2004) hanno riportato i dati relativi a 184 pazienti di età <38 anni, sottoposte a GnRH-a *long protocol*. I risultati ottenuti hanno confermato come la somministrazione tempestiva di rLH sia in grado di garantire un significativo incremento della qualità ovocitaria/embrionaria rispetto al solo

aumento della dose di rFSH. Anche in questo studio non si sono evidenziate differenze significative nei livelli di LH circolanti tra le pazienti che hanno tratto vantaggio dalla supplementazione con ormone esogeno e quelle in cui non è stato necessario somministrare il farmaco.

È da sottolineare come in quest'ultimo studio, in quello di Lisi *et al.* (2004) e nelle nostre tre esperienze sperimentali illustrate (De Placido *et al.* 2001, 2004, 2005), tutte le pazienti con risposta subottimale all'ICFM sottoposte a protocollo *step up* avessero richiesto una dose cumulativa di rFSH >4000 UI per ottenere mediamente 5-6 ovociti. Nell'insieme, questi studi hanno consentito l'identificazione di un sottogruppo a sé stante di pazienti normogonadotrope, non altrimenti inquadrabile. Tale sottogruppo, infatti, esula dalla definizione di *poor responders* che implica il recupero di meno di 3-4 ovociti e di un E<sub>2</sub> al picco <500 pg/ml. Analogamente, l'inquadramento quali *normal responders* risulta inopportuna, data la necessità di dosaggi di rFSH sensibilmente elevati e di durata della stimolazione mediamente più lunga. A tale scopo abbiamo coniato la definizione di ***steady responders***; trattasi di un *subset* di pazienti che si colloca tra le *normal* e le *poor responders* la cui risposta ovarica può trarre grande beneficio da una supplementazione esogena di rLH. [Fig. 4]

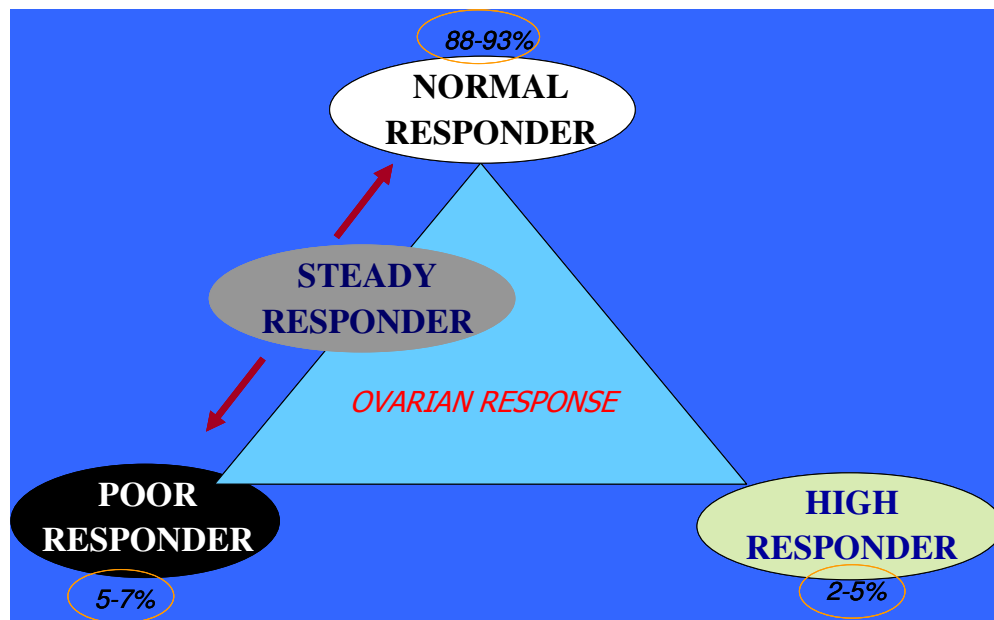


Fig. 4

L'impatto nella pratica clinica di queste osservazioni sembra essere rilevante: in presenza di una storia clinica di richiesta di alte dosi di rFSH durante una precedente ICFM, si possono considerare, per una ristimolazione, farmaci contenenti rLH. In caso di primo ciclo di stimolazione, una identificazione precoce di un profilo anomalo di risposta al rFSH può permettere una integrazione tempestiva ed adeguata con rLH. In conclusione, la risposta ovarica all'FSH (in corso o in cicli precedenti) può presentare un criterio pratico per la scelta di terapie miste, a base di FSH ed LH. L'applicazione di tali criteri potrebbe riflettersi in una ottimizzazione dei risultati e nell'evitare inutili ristimolazioni.

### Cap. 3

#### Discussione dei dati sperimentali

##### **b. Polimorfismo dell'LH**

Un aspetto rilevante emerso dagli studi sopra riportati riguarda l'assenza di correlazioni tra livelli sierici circolanti di LH endogeno ed effettiva richiesta di LH esogeno. In altre parole, concentrazioni endogene di LH non risultano essere predittive nei confronti né della risposta alla monoterapia con rFSH né del potenziale impatto di una supplementazione con LH esogeno. Tali riscontri potrebbero essere riconducibili ad una non corrispondenza tra "quantità" di LH (immunoreattivo) e "qualità", ovvero attività biologica effettiva, della molecola nativa. Da queste osservazioni ha preso origine l'ipotesi che la presenza di un LH meno attivo *in vivo*, pur essendo compatibile con il riscontro di una normale funzionalità ovarica spontanea, potrebbe slentizzarsi in corso di stimolazione ovarica controllata: la variante ormonale si rivelerebbe inadeguata nel sostenere la crescita follicolare multipla, dando origine ad un quadro clinico di apparente "resistenza" ovarica alla monoterapia con FSH.

Le gonadotropine ipofisarie sono solitamente caratterizzate da una elevata eterogeneità; esse infatti, più che come singole glicoproteine, devono essere considerate come una famiglia di forme eterogenee, dotate di varia attività immunologica e biologica. Queste diverse isoforme originano in vario modo: differente azione del DNA, alterazione dei meccanismi di legame dell'RNA, mutazioni puntiformi, modificazioni carboidratiche post-trascrizionali. Il risultato delle variazioni è quello di alterare la struttura e la *clearance* metabolica delle glicoproteine, modificandone la capacità di legame e l'attività *in vivo*. Le numerose isoforme hanno diverso peso molecolare, diversa emivita circolante e diversa attività biologica. Durante un normale ciclo mestruale, almeno 10-30 isoforme delle gonadotropine sono presenti nel sangue circolante. L'attività complessiva delle gonadotropine è pertanto dovuta agli effetti di questa mistura di isoforme che raggiungono e si legano ai recettori nei tessuti bersaglio. La possibilità che si formi una o l'altra isoforma è influenzata sia qualitativamente che quantitativamente dal GnRH e dal *feed-back* degli ormoni steroidei. Le mutazioni dei geni delle gonadotropine sono

LH-β      H<sub>2</sub>-SER-ARG-GLU-PRO-LEU-ARG-PRO-TRP-CYS-HIS-PRO-ILE-ASN-ALA-ILE-LEU-ALA-VAL-GLU-LYS-  
 LH-VAR-β      H<sub>2</sub>-SER-ARG-GLU-PRO-LEU-ARG-PRO-ARG-CYS-HIS-PRO-ILE-ASN-ALA-THR-LEU-ALA-VAL-GLU-LYS-

29

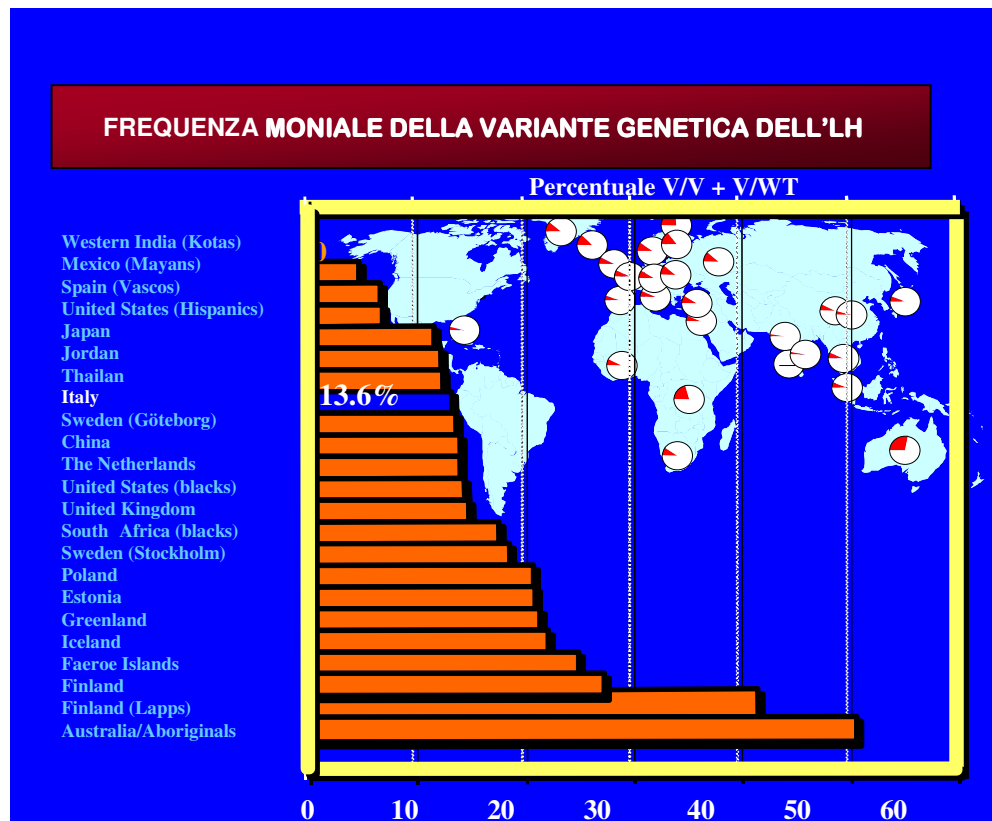


Fig. 6

La peculiarità della V-β variante sembra essere la maggiore bioattività intrinseca *in vitro*, ma la minore emivita in circolo *in vivo* rispetto alla forma nativa o *wild-type*, che si riflette sulla predisposizione ai portatori mono- ed eterozigoti a disturbi della funzione pituitaria, come pubertà ritardata, sindrome dell'ovaio policistico, infertilità, carcinoma prostatico e mammario. Nelle donne finora studiate per la presenza di tale variante, sia in forma omo- che eterozigote, alcuni autori hanno riscontrato un aumento di incidenza di patologie quali abortività ripetuta ed irregolarità mestruali, laddove altri non hanno ritrovato differenze significative in termini di patologia ginecologica rispetto ai controlli. La frequenza dell'Vβ-LH si è dimostrata più alta in donne con PCOS, in particolare in quelle con valori di BMI >28 kg/m<sup>2</sup>, le quali mostrano più alti livelli sierici di testosterone, E<sub>2</sub> e *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG), suggerendo che tale condizione provoca alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico (Rajkhowa *et al.*, 1995). Sembra inoltre che la Vβ-LH condizioni anche la sequenza degli eventi caratteristici della pubertà maschile, andando ad interagire con il fattore di crescita di

tipo I simil-insulinico, implicato nella crescita staturale e nello sviluppo testicolare (Raivio *et al.*; 1996). Nuove ricerche focalizzano l'attenzione verso mutazioni addizionali della sequenza genica del *promoter* del V $\beta$ -LH in particolare: sono state, infatti, scoperte otto mutazioni della base nucleotidica posta nella posizione 661 in prossimità del 5' del gene della gonadotropina. Da studi effettuati su donne affette da carcinoma ovarico, né i livelli sierici di LH *wild-type* né quelli di V $\beta$ -LH sembrano associati ad un rischio maggiore di sviluppare la patologia (Akhmedkhanov *et al.* 2001).

L'ipotesi è, quindi, che questa variante funzioni adeguatamente in condizioni normali, ma evidenzia una insufficiente attività biologica in condizioni di *stress*, quali la soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario dopo somministrazione di GnRH-a e la stimolazione ovarica con rFSH esogeno per la ICFM. Una parte di pazienti che presentano una *steady response* potrebbe allora essere portatrice della variante biologica dell'ormone, che recupererebbe il profilo di normale risposta ovarica con la somministrazione esogena di un LH dotato di una bioattività *standard* come quello ricombinante.

Abbiamo quindi disegnato uno studio il cui obiettivo primario è quello di verificare la possibile relazione tra la presenza della V $\beta$ -LH e la risposta ovarica alla monoterapia con rFSH, in pazienti normogonadotrope sottoposte a PMA (Alviggi C, *et al.* 2006; Ranieri A, *et al.* 2006). Cinquantasette pazienti sottoposte a GnRH-a *long protocol* con rFSH sono state valutate retrospettivamente. In base al consumo di rFSH totale le pazienti sono state suddivise in tre gruppi: 20 donne che avevano richiesto una dose cumulativa di rFSH >3500 UI hanno costituito il gruppo A; 15 pazienti in cui era stata somministrata una dose cumulativa compresa tra 2000 e 3500 UI sono state incluse nel gruppo B; 22 donne che avevano ricevuto una dose <2000 UI sono state selezionate come controllo (gruppo C). È stato raccolto un campione ematico e la presenza della variante è stata valutata con specifici *immunoassays*. In particolare, per testare la presenza della variante V- $\beta$ LH sono stati impiegati due diversi saggi immunofluorometrici a fase solida, con due siti IFMA (Pettersson e Söderhom, 1994), in grado, il primo, di riconoscere l'LH *wild type* (wt), l'altro sia il wt sia la V- $\beta$ LH. Lo stato della variante veniva identificato in base al rapporto fra le misurazioni rilevate dai due saggi: un valore maggiore di 0,9 identificava una condizione di omozigosi per l'LH wt, uno compreso fra 0,2 e 0,9 quella di eterozigosi per la V- $\beta$ LH; in presenza di un valore minore di 0,2 veniva identificato lo stato di omozigosi per la V- $\beta$ LH (Nilsson *et al.*, 1997). Il numero medio di fiale di rFSH è stato significativamente inferiore nel gruppo C ( $17,64 \pm 4,08$ ) rispetto al gruppo A

(51,50 ± 6,35, p <0,001) e al gruppo B (34,0 ± 5,50, p <0,001). La differenza fra i due gruppi di studio, A e B, è anche risultata statisticamente significativa (p <0,01, Tab. 4). La durata della stimolazione è stata significativamente maggiore nel gruppo A (13,5 ± 1,0 giorni) rispetto al gruppo B (11,11 ± 1,39 giorni, p <0,01) e al gruppo C (11,36 ± 1,12 giorni, p <0,01). La differenza fra i gruppi A e B non è risultata statisticamente significativa. Il numero medio di ovociti recuperati nel gruppo A (7,25 ± 1,5) è stato significativamente basso in confronto al numero osservato nel gruppo B (11,67 ± 2,39, p = 0,033) e C (14,73 ± 4,07, p = 0,001). La differenza fra i gruppi B e C è apparsa statisticamente significativa (p = 0,047). Il numero medio di embrioni trasferiti è stato simile in tutti e tre i gruppi. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative in termini di tassi cumulativi di gravidanza, tassi di abortività e tassi di *ongoing pregnancy*. Per quanto concerne le variabili ormonali, si sono rilevati livelli basali di FSH, LH ed E2 comparabili nei tre gruppi. Al contrario, i livelli di LH dopo soppressione pituitaria sono apparsi più bassi nei gruppi A e B (0,75 ± 0,297 UI/L e 1,02 ± 0,2 UI/L) rispetto al gruppo C (1,71 ± 0,68 UI/L) e la differenza è risultata statisticamente significativa (B vs C p <0,01 ; A vs C p <0,05). All'8° giorno di stimolazione sono stati osservati livelli circolanti di LH significativamente più alti nel gruppo C (1,72 ± 0,68 UI/L) rispetto al gruppo A (0,84 ± 0,21 UI/L) (p <0,05); al contrario, non è stata rilevata alcuna differenza né tra gruppo A e gruppo B (1,02 ± 0,21 UI/L), né tra i gruppi B e C. I livelli sierici di E2, valutati al giorno della somministrazione di hCG, sono risultati significativamente più bassi nel gruppo A (1579,00 ± 564,25 pg/mL) rispetto al gruppo B (2785,89 ± 745,46 pg/mL) ed al gruppo C (2725,91 ± 794,429 pg/mL) (A vs B p = 0,014; A vs C p = 0,016); non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa fra il gruppo B e C. Nella popolazione di studio è stato identificato un totale di sette pazienti con Vβ-LH. Sei portatrici della variante (2 in omozigosi e 4 in eterozigosi) sono risultate appartenere al gruppo A; una portatrice, eterozigote, è stata identificata nel gruppo B, nessuna nel gruppo C.

I dati sopra riportati suggeriscono come in un determinato sottogruppo di pazienti giovani, normogonadotrope, la presenza della V-βLH possa tradursi in una significativa diminuzione della risposta ovarica all'rFSH durante cicli di PMA e, quindi, riflettersi in un sensibile incremento del consumo di farmaco. In particolare, nella popolazione esaminata, il numero di ovociti recuperati, indice sensibile di risposta ovarica, è risultato statisticamente più alto nelle pazienti che hanno richiesto un dosaggio minore di FSH



(gruppi B e C), rispetto a quelle che hanno richiesto la dose cumulativa più elevata (gruppo A). La migliore risposta ovarica al rFSH si è, inoltre, associata ad un miglioramento parallelo dei tassi di impianto e di gravidanza. Questi dati, valutati nell'insieme, sembrano supportare l'ipotesi formulata inizialmente che una resistenza ovarica all'FSH possa essere riconducibile ad una scarsa cooperazione dell'attività LH, ovvero alla presenza di un'attività biologica LH subottimale, legata verosimilmente ad una minore emivita della stessa. Nonostante l'esigua dimensione campionaria, va sottolineato come, nell'ambito dell'intera popolazione di studio, la frequenza della variante (12,3%) sia risultata sovrapponibile a quella rilevata nella popolazione italiana generale (13,6%). Il dato assume maggiore significato se la distribuzione della variante viene rapportata alla risposta ovarica: nel gruppo con resistenza maggiore all'FSH (gruppo A), infatti, essa è risultata pari al 30% (6/20), laddove nel gruppo contrassegnato da migliore *outcome* non sono state evidenziate varianti (0/22).

#### Cap. 4

##### Conclusioni e nuove prospettive

##### **La Farmacogenomica nella ICFM**

Le linee di ricerca fin qui esposte hanno evidenziato come in un determinato sottogruppo di pazienti giovani, normogonadotrope che si sottopone a ICFM con solo FSH in un GnRH-a *long-protocol* sia necessaria la supplementazione di LH per ottenere una risposta ovarica adeguata. Abbiamo definito tale condizione “*steady response*”. In uno studio “*dose finding*” prima, e di “*efficacia*” poi, abbiamo quantizzato l’entità di tale supplementazione e ne abbiamo stabilito le modalità. Infine, abbiamo verificato come la presenza della V- $\beta$ LH possa tradursi in una significativa diminuzione della risposta ovarica al rFSH durante cicli di PMA. La tappa successiva, sotto il profilo della ricerca clinica, sarebbe quella di testare, nell’ambito di uno studio prospettico randomizzato, gli effetti di un’aggiunta di rLH in donne portatrici della V $\beta$ -LH nelle fasi precoci dell’ICFM (3<sup>0</sup>-5<sup>0</sup> giorno di stimolazione).

In altre parole, mentre sul piano clinico la necessità di una supplementazione con LH tende ad emergere non prima della 7-8<sup>a</sup> giornata di stimolazione, l’identificazione *a priori* delle pazienti da sottoporre a tale integrazione potrebbe consentire un’anticipazione del trattamento, con conseguenziale riduzione del numero di giorni di stimolazione e del numero di fiale di gonadotropine somministrate.

Se i risultati di tale ulteriore spunto sperimentale su di una popolazione di studio adeguatamente ampia dovessero confermare l’ipotesi inizialmente formulata nella nostra esperienza di ricerca, si verrebbe a delineare la possibilità di identificare con precisione, prima di intraprendere un ciclo di stimolazione, pazienti che necessitano di una supplementazione di LH; di qui la possibilità ulteriore di calibrare e personalizzare, secondo i più moderni principi della “**farmacogenomica**”, i singoli trattamenti. Ne deriverebbero evidenti benefici in termini di rapporti costi/benefici sia per la minore durata dei trattamenti e per il minor consumo di fiale, sia per la diminuzione del numero di cicli ripetuti per il presumibile aumento dei tassi di gravidanza.

Tale approccio potrebbe tradursi in un maggiore adeguamento della scelta terapeutica alle esigenze delle pazienti e, quindi, nella possibilità di ridurre i rischi di accumulo e

morbilità, nonché di migliorare il risultato di cicli di PMA. Non ultimi, visto il costo di tali preparati farmacologici, si determinerebbero concreti vantaggi in termini farmacoeconomici con notevole risparmio sulla spesa farmaceutica a carico del sistema sanitario pubblico.

## Bibliografia

Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Pettersson K, Huhtaniemi I (2001) Luteinizing hormone, its beta-subunit variant, and epithelial ovarian cancer: the gonadotropin hypothesis revisited. *Am J Epidemiol*; 154: 43-9.

Alviggi C, Mollo A, Clarizia R, Ranieri A, De Placido G (2006) Who needs LH in ovarian stimulation? *Reproductive BioMedicine Online*; 12(5):35-43.

Antoine JM (2002) Contribution of exogenous LH during ovarian stimulation: against a systematic indication. *Gynecol Obstet Fertil*; 30(1):83-5.

Ben-Amor AF, on behalf of the Study Group (2000) The effect of luteinising hormone administered during late follicular phase in normo-ovulatory women undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod*; 15:46-50.

Chappel SC and Howles C (1991) Revaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovulatory process. *Hum Reprod*; 6:1206-12.

De Placido G, Mollo A, Alviggi C, Strina I, Varricchio MT, Ranieri A, Colacurci N, Tolino A, Wilding M (2001) Rescue of in vitro fertilisation cycles by human menopausal gonadotropin in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterised by a poor initial response to recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*; 16:1875-79.

De Placido G, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Ranieri A, Alviggi E, Wilding M, Varricchio MT, Borrelli AL and Conforti S (2004) Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clin Endocrinol*; 60:637-643.

De Placido G, Alviggi C, Perino A, Strina I, Lisi F, Fasolino A, De Palo R, Ranieri A, Colacurci N and Mollo A on behalf of the Italian Collaborative Group on Recombinant Human Luteinizing Hormone. (2005) Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Human Reproduction*; 20(2):390-396.

Ericson GF (1995) The ovary: basic principles and concepts, on Feling P, Baxter JD, Broadus AE, Fromman LA: *Endocrinology and Metabolism* – New York, McGraw-Hill Book Co.: 973-1015.

Falk B (1997) Site of production oestrogen in rat ovary as study by microtransplants. *Acta Physiol Scand*; 47:1-101.

Fauser BC (2002) Role of LH in ovarian stimulation: present and future. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*; 31(2 Pt 2):1S20-1S2

Fanchin R (2002) LH Day: floodlights on a forgotten compound. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*; 31(2 Pt 2):1S5-1S6

Feldberg D, Farhi J, Ashkenazi J, Dicker D, Shalev J, Ben Rafael Z (1994) Minidose gonadotrophin-releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril*, 62:343-6.

Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, D'Angelo A, Farfalli V, Montanaro N (2004) Exogenous luteinising hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril*; 82:1521-26.

Filicori M (1999) The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*; 71: 405-14.

Filicori M and Cognini E (2001) Roles and novel regimens of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1437-1441.

Filicori M (2003) Use of luteinizing hormone in the treatment of infertility: time for reassessment? *Fertil Steril*; 79, 253-255

Huhtaniemi I, Jiang M, Nilsson C, Petterson K (1999) Mutation and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol*; 151: 89-94.

Huhtaniemi I, Pettersson KS (1999) Alterations in gonadal steroidogenesis in individuals expressing a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 69: 281-5.

Huhtaniemi I and Themmen A (2000) Mutation of gonadotropins and gonadotrophin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *End Rev*; 21: 551-583.

Haavisto AM, Pettersson K, Bergendhal M, Virkamaki A, Huhtainemi I (1995) Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 1257-63.

Levy DP, Navarro JM, Schattman GL, Davis OK, Rosenwaks Z (2000) The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH, let's design the future. *Hum Reprod*; 15: 2258-2265.

Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe G, Picconeri MG, Cambell A and Rowe P (2001) Use of recombinant FSH and recombinant LH in multiple follicular stimulation for IVF: a preliminary study. *Reprod Biomed Online* 3, 190-194.

Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werling L and Kelly E (2004) Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online* 8, 175-182.

Nilsson C, Jiang M, Pettersson K, Iitia A, Simonsen H, Eastel S, Herrera JR, Huhtaniemi I (1998) Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassay. *Clin Endocrinol*; 49:369-78.

Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Torrisi C, Hazout A, Glissant M, Fernandez H, Frydman F (1996) A protocol using a low dose of gonadotrophin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients with high follicle-stimulating hormone concentrations on day 3. *Hum Reprod*; 11:1169-72.

Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I (1992) An immunological anomalous luteinizing hormone variant in healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab*; 74: 164-71.

Pettersson K (1994) Genetic polymorphism found in the LH  $\beta$  gene of an immunologically anomalous variant of human luteinizing hormone. *Eur J Endocrinol*; Suppl 2: 65.

Polan LP (1986) Ovulation induction with human menopausal gonadotropin compared to urinary follicle-stimulating hormone result in a significant shift in follicular fluid androgen levels without discernible in granulosa-luteal cell function. *J Clin Endocrinol Metab*; 63: 1284-1291.

Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R, Siimes MA, Hagenas L, Nilsson C, Pettersson K, Dunkel L (1996) The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab*; 81: 3278-3282.

Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW, Pettersson K, Haavisto AM, Huhtaniemi I, Clayton RN (1995) Prevalence of an immunological LH- beta variant in UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol*; 43: 297-303.

Ravhon A, Aurell R, Lawrie H, Margara R, Winston RM (2000) The significance of delayed suppression using buserelin acetate and recombinant follicle-stimulating hormone in a long protocol in vitro fertilisation program. *Fertil Steril*, 73(2): 325-329.

Schoot DC, Coelingh Bennink HJ, Mannaerts BM, Lamberts SW, Bouchard P, Fauser BC (1992) Human recombinant follicle stimulating hormone induces growth of preovulatory follicles without concomitant increase in androgen and oestrogen biosynthesis in women with isolated gonadotrophin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*; 74:1471-73.

Sills ES, Levy DP, Moomji M, McGee M, Rosenwaks Z (1999) A prospective, randomized comparison of ovulation induction using highly purified follicle-stimulating hormone alone and with recombinant human luteinizing hormone in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*; 14:2230-5.

Surrey E and Schoolcraft W (2000) Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*; 73: 667-677.

Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC, Taylor AE, Clayton RN, Rajkova M, White D, Franks S, Anttila L, Pettersson KS, Huhtaniemi IT (1999) A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 1711-5.

Tasdermir M (1996) Short protocol of gonadotropin releasing hormone agonist administration gave better results in long protocol poor-responder in IVF-ET. *J Obstet Gynaecol Res*; 22: 73-77.

The Ganirelix dose-finding study group (1998) A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Hum Reprod*; 13(11): 3023-31.

Werlin L (2001) A Multi-Center, Randomized, Comparative, Open-label Trial to Assess the Safety and Efficacy of Gonal-F® (r-hFSH) versus Gonal-F® and recombinant human Luteinizing Hormone (r-hLH) in Patients Undergoing ICSI.

Westergaard LG, Laursen SB and Andersen CY (2000) Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotropin women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod*; 15: 1003-1008.